

Mainz 1976

UNTERSUCHUNG ZUR LEISTUNGSFÄHIGKEIT
DER STOFFWECHSEL-NACHWEIS-REAKTION VON BAKTERIEN
MITTELS VORFABRIZIERTER TESTMEDIEN (API-SYSTEM)

HUBERT KÄMPF

1976

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
des Bakteriologisch-Serologischen Instituts
der Städtischen Krankenanstalten, Karlsruhe
Direktor: Professor Dr. med. R. Ringelmann

UNTERSUCHUNG ZUR LEISTUNGSFÄHIGKEIT
DER STOFFWECHSEL-NACHWEIS-REAKTION VON BAKTERIEN
MITTELS VORFABRIZIERTER TESTMEDIENTEN (API-SYSTEM)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,

den Medizinischen Fachbereichen
vorgelegt von

HUBERT KÄMPF

aus Eschenbach/Opf.

Mainz 1976

Fachbereichsdekan: Professor Dr.P.Klein
Referent: Professor Dr.R.Ringelmann
Korreferent: Professor Dr.W.Bredt
Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juni 1976



INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Einleitung</u>	5
2.	<u>Ziel der vorliegenden Arbeit</u>	6
3.	<u>Material und Methodik</u>	7
3.1	Herkunft der Keime	7
3.2	Nährmedien	8
3.3	Biochemische Differenzierung	9
3.4	Reaktionsmechanismus der verschiedenen Testreaktionen	10
3.5	Inokulation der Nährmedien	12
4.	<u>Versuchsplanung</u>	12
5.	<u>Ergebnisse</u>	14
5.1	Eindeutigkeit der Ablesung der Reaktionen	14
5.2	Abhängigkeit der Nachweisreaktionen von der Konzentration des Inokulums von der Keimspezies und zeitlicher Verlauf des Umschlages	20
5.2.1	Zeitlicher Ablauf der Farbumschläge in Abhängigkeit von der Bakterienkonzentration des Inokulums	20
5.2.2	Zeitpunkte des Indikatorumschlages in Abhängigkeit von der Stoffwechsel-Reaktion	24
5.2.3	Zeitpunkt des Indikatorumschlages in Abhängigkeit von den Bakterienspezies	26
5.3	Vergleich der Reaktionsergebnisse des API-Systems mit den entsprechenden Methoden der klassischen Bunten Reihe	28
5.3.1	Analyse der Diskordanzen nach Stoffwechselreaktionen	29
5.3.2	Analyse der Diskordanzen nach Keimspezies	34
6.	<u>Diskussion</u>	35
6.1	Technische Bewertung des API-Systems	35
6.2	Handhabung, Beurteilung und Fehlerquellen des API-Systems	35
6.3	Grenzen des Einsatzes des API-Systems	37
6.4	Forderung an die Durchführung der großen Bunten Reihe	38
6.5	Praktische Handhabung des API-Systems	39
7.	<u>Zusammenfassung</u>	41
8.	<u>Literaturhinweise</u>	42



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555607_0058

1. Einleitung

Basis der taxonomischen Zuordnung von Bakterien sind die Form und die Anfärbarkeit bei mikroskopischer Untersuchung, die Morphologie der Kolonien und ihre Wachstumsphysiologie sowie die Prüfung von Stoffwechseleigenschaften. Letztere werden häufig unter der Bezeichnung "BUNTE REIHE" (BR) zusammengefaßt. Zur weiterführenden Differenzierung können die Bestimmung antigener Determinanten an der Zelloberfläche oder im Zellinnern, der Nachweis von Rezeptoren für Phagen, die Charakterisierung des Basenquotienten der Zell-DNA und die gaschromatische Analyse von Zellbestandteilen oder die elektronenmikroskopische Darstellung eingesetzt werden. Diese letzteren Methoden sind aber heute noch nicht in der täglichen Routine eines medizinisch-diagnostischen Labors möglich.

Die taxonomische Zuordnung von Bakterien aus menschlichem Untersuchungsmaterial mit möglicherweise pathogener Bedeutung sollte folgenden Kriterien genügen:

1. Die Keimdifferenzierung soll möglichst rasch erfolgen, vor allem sollte die Übermittlung des Antibiotogramms als Grundlage einer gezielten Chemotherapie nicht durch zeitraubende oder nachträglich notwendige Differenzierungsmethoden verzögert werden.
2. Die Keimdifferenzierung muß sich auf verlässliche Techniken und Eigenschaften des Keimes stützen.
3. Die Erstdifferenzierung sollte sich auf eine Auswahl von Eigenschaften stützen, die auf Grund von mikroskopischem Bild und Kulturmorphologie der vermuteten Bakterienspezies angepaßt sind.
4. Eine umfassendere Differenzierung sollte aber, evtl. als Nachbefund, bei Keimen durchgeführt werden,
 - die schwere klinische Erscheinungsbilder verursachen,
 - die bei der Erstdifferenzierung nicht eindeutig zuzuordnen sind,
 - die bei chronischen Krankheitsbildern isoliert werden, bei welchen mit Rezidiven, Keimwechsel und Resistenzzunahme unter der Behandlung gerechnet werden muß,

- die von epidemiologischer Bedeutung sind, z.B. im Rahmen der Bekämpfung von Hospitalinfektionen, und schließlich
- die für die wissenschaftlichen Fragen von Interesse sind.

2. Ziel der vorliegenden Arbeit

Im ersten Teil der Arbeit soll ein kommerziell vertriebenes System zur Durchführung von 10 oder 20 verschiedenen Reaktionen der "Bunten Reihe" mit Hinblick auf folgende Kriterien überprüft werden.

1. Eindeutigkeit der Ablesung der einzelnen Reaktionen,
2. Zeitbedarf für die Ablesung,
3. Abhängigkeit der Ablesung von der Konzentration des Inokulums,
4. Leistungsfähigkeit der einzelnen Nachweis-Reaktionen bei verschiedenen Keim-Spezies, und schließlich
5. Übereinstimmung der API - Nachweisreaktionen mit dem Reaktionsergebnis der klassischen BR.

Im zweiten Teil der Arbeit soll dann Stellung genommen werden zu folgenden Fragen:

Nach welchen Kriterien ist die taxonomische Zuordnung der hier aus dem Untersuchungsgut isolierten Bakterien in einem medizinisch-diagnostischen Labor sinnvoll?

Welche Reaktionen der BR sind ausreichend für eine 90 oder 95%-ige Sicherheit der Zuordnung?

Es wird schließlich versucht, einen Vorschlag zum Ablauf der Differenzierungswege im klinisch-mikrobiologischen Labor zu erarbeiten.

Abkürzungen, die in den folgenden Abschnitten zur Anwendung kommen:

API : Analytab Products Inc. 919 Third Avenue, New York

API-System : 20 biochemische Reaktionen zur Identifikation der Familie der Enterobacteriaceae

BAG : Biologische Arbeitsgemeinschaft GmbH,
 Pharmazeutische Fabrik, 6302 Lich 1

Bakteriennamen : s. S. 4 + 5

BR : Bunte Reihe

Pathotec - Co : Teststreifen zum Nachweis von Cytochrom Oxydase
 Warner Lambert Company, Morris Palins, N.J. USA

Sp : Spezies

3. Material und Methoden

3.1 Herkunft der getesteten Keime

Alle Bakterien entstammten menschlichem Untersuchungsmaterial, mit Ausnahme eines Flavobacteriums, das aus einer Hospitalismus-Untersuchung, und eines Pasteurella-Keimes, der aus Lymphknoten eines Versuchstieres isoliert wurde.

Bei den getesteten Keimen handelte es sich ausschließlich um gramnegative Stäbchenbakterien der Familien Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Spirillaceae, Achromobacteraceae und Brucellaceae. Die untersuchten 35 Salmonellen und 1 Stamm von Shigella sonnei waren serologisch bereits bestimmt.

Die in dem Zeit-Konzentrations-Versuch und die bei dem Vergleich des API mit der BR verwendeten Bakterien, insgesamt 190 Keime, (s. Anhang) teilten sich auf:

<u>Pseudomonadaceae:</u>	1 Pseudomonas fluorescens
	18 Pseudomonas aeruginosa
<u>Spirillaceae:</u>	2 Aeromonas liquefaciens
<u>Achromobacteraceae</u>	4 Alcaligenes faecalis
	2 nicht zuordenbar
	1 Acinetobacter
	1 Flavobacterium
<u>Brucellaceae:</u>	1 Pasteurella Sp.
<u>Escherichiae:</u>	20 Escherichia coli
	5 Alcalescens dispar
	1 Shigella sonnei

<u>Salmonellae:</u>	4 Citrobacter
	10 Salmonella panama
	10 S. typhi murium
	4 S. enteritidis
	4 S. infantis
	1 S. typhi
	1 S. anatum
	1 S. tennessee
	1 S. montevideo
	1 S. braenderup
	1 S. abony
	1 S. agona

<u>Klebsiellae:</u>	23 Klebsiellae pneumoniae
	8 K. pneumoniae oxytoca
	8 Enterobacter aerogenes
	11 Enterobacter cloacae
	2 Enterobacter hafniae
	4 Enterobacter agglomerans
	2 Pectobacterien
	9 Serratia liquefaciens

<u>Proteae:</u>	2 Proteus vulgaris
	14 Proteus mirabilis
	9 Proteus rettgeri
	2 Proteus morganii
	1 Providencia stuartii

Das hier verwendete Taxonomie-Schema ist modifiziert nach Cowan & Steel (7) sowie L. Hellmann (12).

Es folgt nicht in allen Punkten der Neuauflage von "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (4).

3.2 Nährmedien

Alle verwendeten Nährböden wurden von den Firmen Oxoid oder Merck als Trockenmedien bezogen und gemäß den Angaben der Hersteller im jeweiligen Handbuch, von Merck (13), von Oxoid (14), angesetzt.

Gelatine-Teststreifen wurden von BAG bezogen.

Der Nachweis von Cytochromoxydase wurde mit Pathotec-Co.-Teststreifen durchgeführt.

Zur Anzüchtung der Keime aus dem Untersuchungsmaterial wurden verwendet:

- 5 % Schafblutagar mit Columbia-Agar Base (Oxoid CM 331) als Grundsubstrat
- oder Fleischextrakt - Pepton-Cystin Agar (C-L-E-D Medium, Oxoid CM 301),
- oder Dextrose-Bouillon (Oxoid CM 175),
- oder Hirn-Herz-Dextrose-Bouillon (Oxoid CM 225),
- oder Müller Hinton Agar (Merck Nr. 5437).

3.3 Biochemische Differenzierung

Bei der klassischen BR wurden verwendet:

1. Nachweis der Kohlehydratspaltung in Fleischextrakt-Pepton-Bouillon mit Zusatz von jeweils 1 % Laktose, Mannit, Inosit, Sorbit, Rhamnose, Saccharose, 1-Arabinose.
Alle Kohlehydrate wurden von Merck bezogen.
2. Nachweis der Citrat-Verwertung als einzige Kohlenstoffquelle:
mittels Simmons-Citrat Agar (Merck Nr. 2501).
3. Nachweis der H_2S -Entstehung beim Eiweißabbau:
mittels Eisen-Zweizucker Agar nach Kligler (Merck Nr. 3913),
und mittels SIM-Nährboden (Merck Nr. 5470).
4. Nachweis von Urease-Aktivität:
mittels Harnstoff Agar nach Christensen (Merck Nr. 8492),
und mittels Harnstoff-Bouillon (Merck Nr. 8483).
5. Nachweis von Indolbildung:
mittels SIM-Nährboden (Merck Nr. 5470).
6. Nachweis von Gelatine-Aktivität:
mittels Gelatine-Teststreifen ((BAG (4))) und
mittels Nährgelatine (Merck Nr. 4069).
7. Voges Proskauer Reaktion:
mittels MR - VP Bouillon (Merck Nr. 5712).
8. Nachweis von Lysindecaboxylase-Aktivität:
mittels LDC-Sulphydrase-Testnährboden nach Costin
(Merck Nr. 5266).
9. Nachweis von Ornithindecaboxylase- und Argininidihydrolase-Aktivität:
mittels O D C - A D H - Testbouillon (Merck Nr. 6943).

10. Nachweis der Beweglichkeit von Bakterien:

mittels SIM-Nährboden (Merck-Nr. 5470).

11. Nachweis von Oxydations- und Fermentations-Vermögen:

mittels OF Testnährboden (Merck Nr. 10282).

Das API-System wurde nach Anweisung des Herstellers verwendet. Zusammensetzung der im API zur Differenzierung verwendeten Nährmedien siehe unter 3.4

3.4 Reaktionsmechanismus der verschiedenen Testreaktionen

1. Nachweis von β -Galaktosidase bzw. der Laktose-Spaltung.

Im API-System ist statt Lactose O-Nitrophenyl mit Galaktose glykosidisch verbunden. Bei der Spaltung dieser Bindung wird der Farbstoff O-Nitrophenol frei.

Im Röhrchentest der sog. BUNTEN REIHE wird Laktose zu Säure abgebaut; der Nachweis mittels Bromthymolblau als Indikator.

2. Nachweis von Arginindihydrolase-, Lyssindecaboxylase sowie Ornithindecaboxylase-Aktivität.

Im API-System wird jeweils ein vollsynthetisches Kulturmedium, pH 6,2, mit der entsprechenden Aminosäure verwendet, bei deren Abbau basische Stoffwechselprodukte entstehen, die eine Änderung des Indikators Phenolrot zur Folge haben.

Bei den Nährmedien der BUNTEN REIHE läuft der Nachweis von ODC und ADH dagegen in zwei Stufen ab. Das Nährmedium hat einen pH-Wert von 6,7 und infolge des Indikators Bromkresolpurpur eine violette Farbe. Im ersten Schritt wird Glucose abgebaut und es kommt zur Gelbfärbung; bei ODC und ADH-Bildung steigt darauf der pH-Wert infolge basischer Produkte wieder an und daraus resultiert dann violette Farbe.

Der Lysin enthaltende Nährboden ist im Vergleich zu A P I auf den sauren pH-Wert von 5,6 eingestellt. Wird LDC gebildet, steigt der pH-Wert an und der Indikator Bromkresolpurpur schlägt um, gleichzeitig können sich dann auch die Bakterien in dem alkalischen Milieu vermehren; bei diesen

können dann noch zusätzlich die H_2S -Bildner durch Schwarzfärbung des Nährmediums nachgewiesen werden.

3. Nachweis der Citrat-Verwertung

Sowohl bei A P I als auch bei der BUNTEN REIHE wird Citrat als einzige Kohlenstoffquelle angeboten. Beim Citrat-Abbau erhöht sich der pH-Wert und der Indikator Bromthymolblau schlägt nach Blau um.

4. Nachweis der H_2S - Bildung

Bei beiden Systemen wurden Thiosulfat und Eisen III - Salz verwendet. Bei H_2S - Bildung entsteht ein schwarzer Niederschlag von Eisensulfid.

5. Nachweis der Ureaseaktivität

Im API-System kommt gepufferter Harnstoff nach Ferguson mit einem pH von 6,3 zur Anwendung. Bei Ammoniakbildung schlägt der Indikator Phenolrot um.

In der BUNTEN REIHE wurden die stark gepufferte Harnstoffbouillon und der schwach gepufferte Harnstoffagar nach Christensen, beide mit einem pH von 6,8, verwendet. Indikator war, wie bei API-System, Phenolrot.

6. Nachweis der Tryptophandesaminaseaktivität

Tryptophan wird zu Indolbrenztraubensäure abgebaut, die mit $FeCl_3$ einen braunen Farbstoff bildet. Dieser Test wurde nur mittels des API-Systems durchgeführt.

7. Nachweis der Indolbildung

Sowohl im API-System wie auch in der BUNTEN REIHE wird hier die gleiche Methode eingesetzt: Tryptophan wird zu Indol abgebaut, welches mit dem zugesetzten Kovacs-Reagenz (Merck) einen roten Farbstoff bildet.

8. Nachweis von Acetoinbildung

Hier unterscheiden sich die Methoden des API-Systems und der BUNTEN REIHE: in der klassischen BR entsteht beim Glucoseabbau Acetoin, im API-System entsteht Acetoin

beim Abbau von Natriumpyruvat.

Bei beiden Methoden wird dann Acetoin in alkalischer Lösung zu Diacetyl oxydiert, welches mit dem Barrit-Reagenz (Kaliumhydroxidlösung 40% und alpha Naphthol-lösung 6%) nachgewiesen wird.

9. Nachweis von Gelatinaseaktivität

Im API-System wird bei Gelatineverflüssigung ein Pigment freigesetzt, das sich gleichmäßig im Röhrchen verteilt. Verglichen wurde damit die Verflüssigung von Nährgelatine, nach Bebrütung bei 37° C und darauffolgender halbstündiger Schräglagerung im Kühlschrank, sowie die Andauung der mit Gelatine beschichteten Teststreifen, ebenfalls nach Bebrütung bei 37° C.

10. Nachweis von Kohlehydratspaltung

Sowohl beim API-System als auch in der BUNTEN REIHE ist die Methode gleich. Durch Spaltung der KH entstehen saure Produkte, die ein Umschlagen des Indikators Bromthymolblau verursachen.

3.5 Inokulation der Medien

Alle Teströhrchen der klassischen BR wurden von einer Kolonie mittels einer Platinöse beimpft, mit der gleichen Öse wurde auf einem letzten Nährboden eine Reinheitskontrolle angelegt. Das API-System wurde mit einer Suspension aus einer Kolonie in 5ml sterilem Aqua dest. mittels Pasteur-Pipette nach Anleitung des Herstellers (4) beimpft.

4. Versuchsplanung

Insgesamt wurden 180 Keime parallel mittels API und der klassischen BR getestet. Im Ablauf der Anzüchtung und Erstdifferenzierung wurden folgende Parameter untersucht:

Mikroskopischer Befund im Originalpräparat des Untersuchungsmediums

Mikroskopischer Befund des angezüchteten Keimes

Koloniemorphologie auf einem Schafblutagar

Koloniemorphologie auf einem Lactoseindikatoragar

ohne Selektivwirkung (CLED-Agar)

Indol-Bildung H_2S -Bildung und Beweglichkeit mittels SIM-Agar.

Urease Aktivität mittels Christensen Agar

Lactose- und Sacharose-Spaltung, sowie H_2S -Bildung im Kligler Agar.

Die bei der weiteren und der vergleichenden Differenzierung angesetzten Reaktionen sind aus den Tabellen zu entnehmen, ebenso wie die Reaktionen des API-Systems.

Die Ergebnisse der sog. kleinen Bunten Reihe, d.h. der mit dem SIM-, Kligler- sowie Christensen Agar erfaßten Reaktionen, wurden von der Routine-Diagnose übernommen und mit denen des API-Systems verglichen.

Die große Bunte Reihe und das API-System wurden parallel mit der gleichen Reinkultur von Bakterien beimpft. Bei beiden Systemen wurden die Reaktionen nach 20 Stunden gleichzeitig abgelesen. Darüber hinaus erfolgte eine Ablesung der großen Bunten Reihe zusätzlich nach 48 und 72 Stunden. Die Bebrütung erfolgte bei $37^{\circ}C$.

In einer ersten Testreihe wurden die biochemischen Reaktionen von 82 Keimen mit beiden Systemen verglichen. In einer zweiten Untersuchungsreihe wurden weitere 98 Keime im Hinblick auf ihre biochemischen Reaktionen verglichen.

Zusätzlich wurden 10 verschiedene Keimspezies zur Durchführung eines Versuches zur Überprüfung des Einflusses der Inokulum-Konzentration auf den Umschlagszeitpunkt der biochemischen Reaktionen des API-Systems herangezogen. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Jeweils eine Kolonie von den zehn verschiedenen Keimspezies wurde auf Müller Hinton Agar im Vierfelderausstrich überimpft und über Nacht bebrütet. Zwanzig Kolonien jeder Spezies wurden mit der Öse entnommen und in jeweils 1ml sterilem Aqua dest. gründlich suspendiert. Durch Vergleich dieser Suspensionen mit Mac Farland Trübungsstandard wurden die Keimkonzentrationen auf je $10^7/ml$ eingestellt. Anschließend wurden Verdünnungen mit Konzentrationen von 10^5 , 10^3 , 10^1 , Keimen pro ml hergestellt. Nach Inokulation der Küvetten des API-Systems mit den verschiedenen Suspensionskonzentraten wurde bei $37^{\circ}C$ bebrütet und

die Farbumschläge halbstündig abgelesen. Lediglich Trytophandesaminase-Aktivität, Indolbildung und Voges Proskauer-Reaktion wurden nur einmal nach 18 Stunden abgelesen.

Schließlich wurden die Farben der Reaktionen des API-Systems hinsichtlich ihrer Eindeutigkeit anhand der getesteten Keime verglichen.

5. ERGEBNISSE

5.1 Als erstes wurde die Frage gestellt: Wie eindeutig sind die Reaktionen des API-Systems abzulesen?

Unter diesem Aspekt erfolgte nach 18-stündiger Bebrütung der API-Küvetten die Ablesung entsprechend dem Farbumschlag für die einzelnen Indikatoren. Als Mischfarben werden solche Farbtöne bezeichnet, die nicht den reinen Indikatorfarben entsprechen.

Die Anleitung (2) zur Ablesung und Beurteilung des API-Systems durch den Hersteller, unterscheidet nur zwischen positiven und negativen Reaktionsausfällen; ein Hinweis auf Mischfarben wird nicht gegeben.

Die Art der hier beobachteten Mischfarben ist in nachfolgender Tabelle 1 angeführt.

Tabelle 1

Farbton der Mischfarben im Vergleich zu den reinen Indikatorfarben

Reaktion	negativ	positiv	Mischfarbe
ONPG	farblos	gelb	blasses Gelb
ADH	gelb	rot	fließende Übergänge
LDC	gelb	rot, orange	gelb-ocker-rosa
ODC	gelb	rot	gelb-ocker-rosa
H ₂ S	farblos	schw. Nieder- schlag	Dunkelfärbung
URE	gelb	rot	ocker
CIT	grün	blau	blaugrün
IND	gelb	rot	orangefarbener Ring
alle KH	blau	gelb	grün bzw. gelb-grün

Bei den restlichen Reaktionen traten keine Mischfarben auf.

Bei der ersten Testreihe von 1972 mit 82 Keimen konnten insgesamt:

82 mal 20 = 1640 Farbumschläge beurteilt werden, die sich wie folgt aufteilten:

Eindeutig abzulesen waren

1547 Reaktionen = 94,4 %

Nicht eindeutige Ablesungen

91 Reaktionen = 5,6 %

Bei der zweiten Testreihe im August 1974 mit 98 Keimen waren

98 mal 20 Farbumschläge = 1960 möglich, die sich wie folgt aufteilten:

Eindeutig abzulesen waren

1888 Reaktionen = 96,4 %

Nicht eindeutige Ablesungen

72 Reaktionen = 3,6 %

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß 5,6 bzw. 3,6 % als Mischfarben zu bezeichnen sind.

Bei der Aufschlüsselung der nicht eindeutig abzulesenden 5,6 bzw. 3,6 % Mischfarben ergibt sich folgende in Tabelle 2 aufgeführte Verteilung der Mischfarben auf die einzelnen biochemischen Reaktionen.

Tabelle 2

Analyse der nicht eindeutigen Reaktionsergebnisse:

nicht eindeutige Ablesung der

	1. Testreihe	2. Testreihe
Reaktion	Anzahl	Anzahl
ONPG	1	0
ADH	24	16
LDC	10	16
ODC	6	12
H ₂ S	13	1
URE	11	4
CIT	5	3
TDA	0	0
IND	1	1
VP	0	0
GEL	0	0
GLU	4	12
MAN	1	1
INO	1	3
SOR	1	0
RHA	2	0
SAC	3	0
MEL	5	1
AMY	1	1
ARA	<u>2</u>	<u>1</u>
	91	72

Beurteilung der nicht eindeutigen Reaktionsausfälle

Eine in der Routine sicher nicht immer vermeidbare Inokulation des Systems mit Mischkulturen wurde bei diesen Testreihen durch vorangehende Klonierung und nachfolgende Reinheitskontrolle des Inokulums ausgeschlossen.

Insgesamt waren von den 3.600 Reaktionen 163, d.h. 4,5 % nicht genau ablesbar.

Annähernd 40 %, in der 1. Testreihe mit 82 Keimen, betrafen die Mischfarben der Reaktionen von ADH, LDC und ODC, wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist. Bei der 2. Testreihe mit 98 Keimen entfallen auf diese Reaktionen etwa 60 % der Mischfarben. Trotz genauer Einhaltung der Vorschriften und Abschluß der entsprechenden Küvetten mit Paraffinöl ließen sich diese Ungenauigkeiten nicht vermeiden. Eine über 18 Stunden hinausgehende Bebrütungsdauer führte nicht zu einer Änderung des Farbtons. Daß die Beurteilung gerade dieser Reaktionen nicht einfach ist, geht auch aus Gebrauchsanleitungen zum API-System hervor.

Nach den Angaben von Analytab Products Inc. (10) liegt ein positiver Reaktionsausfall bei den Aminosäuredecarboxylasetests dann vor, wenn der Farbton rot erscheint. Nach den Anleitungen der BAG (1) ist die Reaktion positiv, wenn der Farbton rot oder orange ist. In einer anderen Gebrauchsanleitung (2) wird ein positiver Reaktionsausfall von LDC mit rot oder orange angegeben, ADH und ODC dagegen werden nur als positiv bewertet, bei Vorliegen des Farbtones rot.

Daß eine Beurteilung dieser Farben nicht immer einfach ist, geht auch aus der Arbeit von Smith (15) hervor, in der es heißt: "Subsequent literature and directions prepared by the manufacturer stated that a red or orange color was indicative of a positive test for lysine decarboxylase".

Der Vergleich mit den Reaktionsergebnissen bei den Nährböden der Bunten Reihe ergab, daß auch besonders beim ADH und ODC Test häufig Mischfarben auftraten, d.h. der als positiv zu wertende Farbton violett lag in vielen Variationen vor, und zwar in den Farbtönen grau und grau-violett.

Es war daher ebenso wie beim API-System schwierig zu beurteilen, ob die Reaktion noch als negativ oder als schwach positiv angesehen werden mußte.

Anders dagegen verhielt es sich mit dem LDC-Testnährboden nach Costin (13). Verglichen mit den 20 nicht eindeutig ablesbaren Reaktionen bei der 2. Testreihe mit dem API-System zeigte er in allen Fällen ein eindeutig negativ oder positives Ergebnis an.

5.2 Abhängigkeit der Nachweisreaktionen von der Konzentration des Inokulums, zeitlicher Verlauf des Farbumschlages und dessen Abhängigkeit von der Keimspezies

5.2.1 Als zweite Frage wurde die Beziehung zwischen der Bakterienkonzentration des Inokulums und dem Umschlagszeitpunkt bei den einzelnen Stoffwechselreaktionen untersucht.

Die Anleitung des Herstellers (4) zur Beimpfung der Klüvetten macht keine genauen Angaben zu diesem Punkt. Nach orientierenden Versuchen darf angenommen werden, daß eine Suspension von 1 Kolonie in 4ml Wasser eine Konzentration von etwa 10^6 Keimen/ml ergibt.

Zur Prüfung der Abhängigkeit des Umschlagzeitpunktes von der Konzentration des Inokulums wurde der folgende Versuch durchgeführt:

Von 10 verschiedenen Keimspezies wurden Stammsuspensionen zu jeweils 10^7 Keimen /ml angesetzt. Ausgehend von diesen wurden Suspensionen mit 10^5 , 10^3 und 10^1 Keimen/ml hergestellt. Mit diesen 4 Suspensionen verschiedener Konzentration wurden parallel 5 API-Systeme beimpft und halbstündlich abgelesen, lediglich die Teste von TDA, Indol und VP wurden nur einmal nach 18 Stunden beurteilt.

In Tab. 3 sind die Ergebnisse dieses Versuches dargestellt. Es wird der Umschlagszeitpunkt in Stunden nach Beimpfung in Abhängigkeit von der Keimkonzentration angegeben.

Aus den Ergebnissen von Tabelle 3 läßt sich folgendes feststellen:

Der Farbumschlag trat bei der Konzentration von 10^7 Keimen/ml durchschnittlich 2,3 Stunden früher ein als bei 10^5 Keimen/ml. Dagegen erfolgte der Farbumschlag bei 10^5 Keimen/ml durchschnittlich 3,7 Stunden früher als bei 10^3 Keimen/ml. Der Farbumschlag bei 10^1 Keimen/ml trat durchschnittlich 4 Stunden später als bei der Konzentration von 10^3 Keimen/ml auf, d.h. je geringer die Konzentration desto stärker ist die Reaktion von der Zeit abhängig.

Auffallend ist, daß die zeitliche Abhängigkeit des Farbumschlages von der Konzentration besonders ins Gewicht fällt, bei einer Keimdichte von weniger als 10^5 Keimen /ml.

Die Intensität der Farbtöne war von diesen hier getesteten Konzentrationen, wie zu erwarten ist, unabhängig, d.h. bei der kleinsten Keimkonzentration war der Farbton genauso deutlich abzulesen, wie bei der größten.

Tab. 3 Zeitpunkt des Farbumschlages in Std. in Abhängigkeit von Konzentration und Spezies.

Konz.	Keimsp.	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT. H ₂ S	Urea	Gel. Glu.	Man.	Ino.	Sor.	Rha.	Sacch.	Mel.	Amy.	Ara.
Farbumschlag in Stunden nach Beimpfung																
E. Coli																
10 ⁷	1	-	-	8	-	-	-	1	2	-	3	-	3	-	-	3
10 ⁵	3	-	-	26	-	-	-	3	3	-	4	6	-	-	-	6
10 ³	8	-	-	-	-	-	-	6	6	-	10	10	-	-	-	12
10 ¹	10	-	-	-	-	-	-	10	10	-	12	14	-	-	-	-
E. Coli																
10 ⁷	2	6	-	-	-	-	-	1	2	-	2	-	-	-	-	3
10 ⁵	6	8	-	-	-	-	-	3	3	-	6	-	-	-	-	6
10 ³	12	14	-	-	-	-	-	6	6	-	6	-	-	-	-	6
10 ¹	14	24	-	-	-	-	-	10	10	-	10	-	-	-	-	10
S. Panama																
10 ⁷	-	6	7	2	6	22	-	-	1	1	-	2	2	-	3	1
10 ⁵	-	8	9	4	8	24	-	-	2	3	-	3	3	-	4	3
10 ³	-	14	15	10	12	45	-	-	6	6	-	6	8	-	8	8
10 ¹	-	24	24	12	12	-	-	-	8	10	-	10	12	-	12	12
K. pneumoniae																
10 ⁷	1	-	8	-	10	-	11	-	1	1	6	2	2	2	2	2
10 ⁵	2	-	12	-	10	-	13	-	2	2	8	3	3	3	3	3
10 ³	6	-	14	-	12	-	14	-	4	6	10	6	6	6	6	6
10 ¹	8	-	16	-	16	-	16	-	6	8	12	8	8	8	8	-
E. cloacae																
10 ⁷	2	14	-	12	6	-	-	-	1	2	-	4	6	3	3	3
10 ⁵	3	16	-	14	8	-	-	-	2	4	-	6	8	4	4	4
10 ³	6	20	-	16	14	-	-	-	6	6	-	8	12	6	8	8
10 ¹	12	24	-	16	16	-	-	-	12	12	-	12	14	12	12	12

Konz.	Keimsp.	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT.	H ₂ S	Urea	Gel.	Man.	Ino.	Sor.	Rha.	Sacch.	Mel.	Any.	Ara.
10 ⁷	Serratia	4	-	8	6	8	-	-	14	1	4	-	6	2	6	2	16
10 ⁵		12	-	10	10	10	-	-	15	3	6	-	12	6	12	4	24
10 ³		14	-	14	14	16	-	-	18	6	8	-	14	8	14	8	-
10 ¹		16	-	16	20	24	-	-	21	12	12	-	16	12	16	12	-
10 ⁷	P.vulgaris	-	-	-	-	8,5	4,5	2	12	2	-	-	-	3	-	3	-
10 ⁵		-	-	-	-	8,5	6,5	3,5	14	4,5	-	-	-	6	-	6	-
10 ³		-	-	-	-	15	10	10,5	21	14	-	-	-	11	-	11	-
10 ¹		-	-	-	-	-	14	21	24	21	-	-	-	24	-	24	-
10 ⁷	P.mirabilis	-	-	-	7	8,5	4,5	2,0	10,5	2	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁵		-	-	-	8	10,5	10,5	4,5	12,5	8,5	-	-	-	-	-	-	-
10 ³		-	-	-	12	14	10,5	10,5	14,0	14,0	-	-	-	-	-	-	-
10 ¹		-	-	-	21	21	12,5	14,0	20,0	24,0	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁷	Ps.aerug.	-	8	15	15	8	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁵		-	14	20	20	12	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ³		-	20	25	23	20	-	-	23	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ¹		-	26	40	26	23	-	-	45	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁷	A.dispar	-	-	-	3	10	-	-	-	1	1	-	3	1	2	2	2
10 ⁵		-	-	-	6	11	-	-	-	2	2	-	4	3	3	3	3
10 ³		-	-	-	8	12	-	-	-	4	6	-	6	6	6	6	6
10 ¹		-	-	-	10	14	-	-	-	8	8	-	8	8	8	8	8

5.2.2 Zeitlicher Ablauf der Farbumschläge mit Blick auf die verschiedenen Stoffwechsel-Reaktionen

ONPG-Test

Der Gelbton bei ONPG wurde ohne besondere farbliche Zwischenstufen erreicht. Bei *Escherichia coli* und *Klebsiellen* war die Farbe nach 4 Stunden Bebrütung am intensivsten, nach 18 Stunden war sie jedoch bereits abgeblaßt. Solche Angaben wurden auch in den Untersuchungen von Doucet (9) gemacht, wörtlich heißt es: "... les reactions sont plus intense a`la sixième heure qu'à la vingtquatrième heure, surtout avec des suspensions denses".

ADH, LDC, ODC-Test

Liegt ein Abbau der Aminosäuren durch die entsprechenden Enzyme vor, so erscheint zuerst ein roter Fleck in der Öffnung der entsprechenden Küvette, welcher sich zunehmend intensiviert und sich dann über das ganze Röhrchen ausbreitet.

Citratverwertung

Diese zeigt sich an durch eine grün-blau Verfärbung der Küvettenöffnung, mit nachfolgender Intensivierung nach blau, bis schließlich das ganze Röhrchen diese Farbe angenommen hat.

Urease-Nachweis

In gleicher Weise, d.h. beginnende Verfärbung in der Öffnung des Röhrchens, aber mit einem roten Farbton, läuft die Verfärbung bei Harnstoff-Spaltung ab.

Gelatine-Test, H_2S -Bildung

Bei Gelatine Andauung und H_2S -Bildung fiel besonders die Abhängigkeit der Reaktionsstärke von der Keim-

spezies auf. Je nach Keim erschienen die Röhrchen bei schwacher Reaktion nur leicht getrübt, bei starker Reaktion aber tiefschwarz.

KH-Spaltung

Die Farbumschläge erfolgen bei den meisten Kohlehydraten schnell. Dabei tritt zuerst ein dunkelblauer Farbton auf, der über grünblau, grün, grüngelb nach gelb umschlägt. Der Übergang kann fließend in 20 Minuten bis nach einem gelben Farbton hin verlaufen sein. Bei Keimen, die Zucker nur schwach fermentieren, bleibt dagegen die Reaktion oft lange auf einem Zwischenfarbton stehen.

5.2.3 Zeitpunkt des Indikatorumschlages in Abhängigkeit von der Bakterienspezies

Bei der Beurteilung dieser Frage wurde immer der Testansatz mit einem Inokulum von 10^6 - 10^7 Keimen /ml herangezogen

E. Coli

Bei den beiden Keimen war die Kohlehydratspaltung bereits nach 3 Stunden vollständig abgelaufen, während der ODC Test erst nach 8 Stunden und der ADH-Test nach 6 Stunden positiv ausfielen und damit für die Diagnose zeitlich limitierend waren.

Salmonella panama

Zeitlich ausschlaggebend war hier die H_2S -Bildung, die erst nach 22 Stunden eindeutig nachweisbar war, während die Kohlehydratspaltung bereits wie bei *E. Coli* nach 3 Stunden vollständig abgelaufen war. Das gleiche gilt für den ODC Test, während ADH- bzw. LDC-Test sowie die Citratverwertung erst nach 6 bzw. 7 Stunden nachweisbar waren.

Klebsiella pneumoniae

Der Nachweis von Urease-Bildung bzw. Citratverwertung war erst nach 11 und 10 Stunden möglich, während der ONPG-Test und die Kohlehydratspaltung mit Ausnahme von Inosit bereits nach 2 Stunden positiv waren.

Enterobacter cloacae

Zeitlich limitierend waren hier der ADH- und ODC-Test, die nach 14 bzw. 12 Stunden positiv wurden. Alle anderen Reaktionen einschließlich der Kohlehydratspaltung waren innerhalb von 6 Stunden positiv ausgefallen.

Serratia

Die Kohlehydratspaltung war mit Ausnahme von Arabinosespaltung nach 6 Stunden positiv. Zeitlich limitierender Faktor war hier der Nachweis von Gelatine-

Andauung, die erst nach 14 Stunden erfolgt war.
LDC- und Citrattest waren nach 8 Stunden positiv.

Proteus mirabilis, *Proteus vulgaris*

Auch hier war wie bei *Serratia* der Nachweis von Gelatine-Andauung erst nach 10 1/2 bzw. 12 Stunden möglich. Alle anderen Reaktionen waren bereits nach 8 Stunden positiv, so daß die Gelatine-Andauung der für die Diagnose zeitlich limitierende Faktor war.

Pseudomonas aeruginosa

LDC- und ODC-Test waren nach 15 Stunden positiv und damit für die Diagnose zeitlich ausschlaggebend, während ADH, Citrat und Gelatine-Test nach 8 Stunden positiv waren.

Alcalescens dispar

Der Nachweis der entsprechenden Kohlehydratspaltung war innerhalb 3 Stunden möglich, während die Citratverwertung erst nach 10 Stunden nachweisbar war.

Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 3 in der Spalte für 10⁷ ersichtlich.

Die Ergebnisse lassen erkennen, daß eine Schnelldiagnose innerhalb eines Tages auch mit dem API-System nicht möglich ist. Mit Ausnahme der Kohlehydratspaltung und des ONPG-Testes, die bei allen Keimspezies, die hier getestet wurden, innerhalb von 6 Stunden positiv waren, variierte der Zeitpunkt des Farbumschlages der anderen Nachweisreaktionen jeweils in Abhängigkeit der entsprechenden Keimspezies. Insgesamt gesehen waren nach 6 Stunden nur ca. 50 % aller möglichen positiven Reaktionen ablesbar.

5.3 Vergleich der Reaktionsergebnisse des API-Systems mit den entsprechenden Standard-Methoden der BR

Bei der ersten Testreihe wurden 82 Keime vergleichend untersucht. Es wurden die Reaktionen von ONPG, CIT., H₂S, URE, IND, VP, GEL, MAN, INO, SOR, RHA, SAC und ARA der BR und des API-Systems miteinander verglichen.

Insgesamt standen 984 Einzelreaktionen zur Auswertung zur Verfügung.

API und BR stimmten in

916 Reaktionen = 93,1 %

überein, während bei

68 Reaktionen = 6,9 %

nicht übereinstimmende Ergebnisse vorlagen.

Bei der zweiten Testreihe kamen 98 Keime zur Untersuchung, wobei statt der oben angeführten KH, MAN, SOR und ARA, ADC, LDC und ODC Differenzierungsnährmedien mit eingesetzt wurden.

Insgesamt standen 1274 Reaktionen zum Vergleich zur Verfügung.

API und BR stimmten in

1198 Reaktionen = 93,9 %

überein, während bei

78 Reaktionen = 6,1 %

nicht übereinstimmende Ergebnisse vorlagen.

Bei beiden Testreihen wurden zusammen 2258 Reaktionen beider Systeme verglichen, von diesen Reaktionen waren 146, d.h. 6,4 %, diskordant, API und BR stimmten also in 93,6 % überein.

5.3.1 Analyse der Diskordanzen nach Stoffwechselreaktionen

Schlüsselt man die 6,4 % Diskordanzen nach Einzelreaktionen auf, so erhält man die in Tabelle 5 folgende Verteilung.

Tab. 5 Verteilung nicht übereinstimmender Reaktionen auf die getesteten 180 Keime.
Die relativ % beziehen sich auf die 146 diskordanten Reaktionen.

Diagnose	ONPG/Lac	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	Urea	TDA	Ind	VP	Gel	Glucose	Man	Ino	Sor	Rha	Sac	Mel	Amy	Ara	OF(ox, f, n)	Oxy	Bew	Gramfärbung	Absolut	relativ %
Escherichia coli	4	2	2	2	1								1		2	1	1								14	9
Alcalescens dispar	1				2																				3	2
Shigella sonnei	1	1	1	1			1		1																3	2
Citrobacter					2	1																			6	4
Salmonellae	3	2	3			2	1		2	1				2		1	1			4					10	7
Klebsiellae																				1					14	9
Enterobacter	8	2	2	2	1		2		2	1	1		2	2	1	2	1			1					25	17
Serratia liquefaciens	5	1	1				2						4	4		1	1								15	10
Protea		1	2	9	2				1	2			3	1	1	1									22	15
Providencia																									1	1
Pseudomonas		1				2	11			7				1	1				3						25	17
Aeromonas liquefaciens	1	1			1			1																	4	3
Acinetobacter																										
Alcaligenes faecalis			1	1						1															2	1
Pasteurellae																										
Flavobacterium																										
	23	8	9	12	7	5	7	0	6	3	11	0	1	12	4	2	6	0	0	9					146	

Zu den in Tabelle 5 aufgezeichneten Ergebnissen läßt sich folgendes sagen:

ONPG-Test

Bei dem ONPG-Test zeigte sich, daß das nachgewiesene Enzym die β -Galactosidase auch dann vorhanden sein kann, wenn Lactose nicht oder nur langsam gespalten wird. In 21 Fällen war der ONPG-Test positiv, während die Laktose-Spaltung negative Ergebnisse zeigte.

13 der insgesamt 23 Fälle entfielen auf die Enterobacter Gruppe, der Rest verteilte sich auf Escherichia coli, Klebsiellae, Shigella sonnei und Aeromonas.

ADH,- LDC- und ODC-Test

Die bei der ADH-Testung auftretenden 8 Diskordanzen verteilen sich auf eine Vielzahl verschiedener Keime. Die Aminosäuredecarboxylase-Tests sind in der klassischen BR technisch schwierig und in der Anwendung begrenzt, da nur Keime erfaßt werden können, die Glukose spalten. Die vorgeschriebene Bebrütungszeit beträgt bis zu 4 Tagen, oft liegen dann noch Farbtöne vor, die sich nicht immer eindeutig ablesen lassen. Eine gerichtete Interpretation ließen die Diskordanzen nicht zu, sie erschienen zufällig.

Im Gegensatz zu ODC und ADH war das LDC-Testnährmedium auch in der BR gut zu beurteilen. Insgesamt traten 9 Diskordanzen auf, davon entfielen 6 auf die Klebsiellen und Enterobacter-Gruppe. Aufgrund der Eindeutigkeit seiner Farben war das in der BR verwendete LDC-Medium nach Costin (13) leichter zu beurteilen als das im API verwendete.

Bei der ODC-Reaktion traten 12 Diskordanzen auf. Auch hier gilt betreffend des in der BR verwendeten Mediums das über den ADH Testnährboden bereits angeführte. In den meisten Fällen war die API-Reaktion positiv und die BR trotz mehr-tägiger Bebrütungsdauer falsch negativ.

Citratverwertung (CIT)

Von 17 Diskordanzen, die bei der Citratverwertung auftraten, entfielen 9 auf die getesteten *Proteus* Spezies. Laut Literatur wird für Citratverwertung angegeben, daß verschiedene biochemische Typen existent sind, d.h. es können sowohl Citrat positive als auch Citrat negative Typen auftreten; da ja die gleiche Kolonie nicht gleichzeitig sowohl auf das API-System und die BR überimpft wurde, könnte sich so das Auftreten der Diskordanzen erklären lassen. Dies gilt jedoch nur für *Proteus mirabilis*. Auffallend ist aber, daß in 12 Fällen die Ergebnisse der BR negativ ausfielen, so daß man den Eindruck gewinnt, die Citratreaktion der BR ist weniger empfindlich als die des API-Systems.

H₂S-Bildung (H₂S)

Anhand des H₂S-Nachweises ist ersichtlich, daß die Empfindlichkeit des API gegenüber schwach H₂S bildenden Keimen geringer ist als der Nachweis mittels Kligler oder SIM-Nährboden der BR. Auffallend war dies vor allem bei *Salmonella typhi*.

Urease-Test (URE)

Die meisten Diskordanzen bei der Harnstoffspaltung traten bei *Pseudomonas aeruginosa* und der *Enterobacter*-Gruppe auf. Diese Unterschiede waren besonders auffällig bei Verwendung der stark gepufferten Harnstoffbouillon in der BR.

Nimmt man den Christensen-Nährboden zum Nachweis der Ureaspaltung, kommt es in diesen Fällen zu konkordanten Reaktionsausfällen. Die positiven Ergebnisse bei *Pseudomonas* könnten darauf basieren, daß nach Cowan Steel (7) eine nicht auf Ureasespaltung beruhende Alkalisierung eintritt.

Indolbildung (IND)

Beim Indolnachweis könnten die Diskordanzen entweder auf eine etwas größere Empfindlichkeit des API-Systems hinweisen, da von 6 Diskordanzen 4 im API-System richtig positive Ergebnisse zeigten, jedoch können Fehlablesungen nicht sicher ausgeschlossen werden.

Acetoin-Nachweis, Voges-Proskauer-Reaktion (VPR)

Die 3 vorliegenden Diskordanzen lassen sich schwer erklären. In einem Fall war bei *Aeromonas* die Reaktion im API positiv. Da in der BR die VP vom Glucoseabbau abhängt und dies im API nicht der Fall ist, kann bei *Aeromonas*, der keine Glucose abbaut, der Nachweis mittels der BR auch nicht erfolgen. Den Ergebnissen nach zu schließen ist die Reaktion im API System stabiler oder empfindlicher.

Gelatinase-Nachweis (GEL)

Im Nachweis der Gelatine-Andauung war die Reaktion im API empfindlicher als die anderer Testreaktionen: Gelatinase-Nachweis mittels Teststreifen oder mittels Nährgelatine. Die API-Reaktion erlaubt auch gut eine Beurteilung der Intensität der Gelatinase-Reaktion. Bei *Proteus* kommt es schnell zu einer starken Diffusion des Pigments, bei *Pseudomonas* erfolgt eine langsame Diffusion mit nur schwacher Schwarzfärbung.

Kohlenhydrat-Fermentation (KH)

Auch bei den KH traten wenig Diskordanzen auf. Gehäuft waren sie bei denjenigen KH zu finden, die nur langsam gespalten werden, wie Inosit und Arabinose. Die API-Nachweisreaktionen waren empfindlicher als die Reaktionen der klassischen BR.

Zusammenfassend läßt sich feststellen:

Bei Urease, Gelatinase, ODC, Inosit und Arabinos sowie bei VP scheint die Nachweisreaktion im API-System empfindlicher zu sein, als die Reaktion der BR. Umgekehrt scheint die Beobachtung, daß beim LDC-Nachweis die Reaktion im LIA Agar öfter positiv war, auf eine geringere Empfindlichkeit des Testmediums im API hinzuweisen.

Die Konkordanz beider Nachweissysteme betrug bei unserer Vergleichsbestimmung 93,6 %. Smith (15) gibt in seiner Arbeit 96,5 % an. Guillermet (11) findet gute Übereinstimmung bei ONPG, Citrat, Urea, TDA, Indol, H_2S , Gelatine und Nitrit und deutlicheren Reaktionsausfall bei der KH-Fermentation im API-System.

5.3.2 Analyse der nicht übereinstimmenden Reaktionen nach Keimspezies

Die meisten diskordanten Reaktionen lagen bei Pseudomonas vor. Sie wurden durch die falsche Alkalisierung von Urea im API-System und mangelnde Gelatine-Andauung der Teststreifen verursacht. Bei den getesteten Proteus waren wahrscheinlich biochemisch differente Typen für die falsch negative Citratreaktion der BR sowie die falsch negative H_2S -Bildung im API-System Ursache für die hohe Prozentzahl an falschen Ergebnissen. Klebsiellen und Enterobacter-Gruppe zeigten weniger Diskordanzen. Hauptsächlich wurden sie durch falsche Ergebnisse von LDC im API und ODC in der BR verursacht. Die wenigsten Diskordanzen traten bei E. Coli und den Salmonellen auf, sie waren vor allen Dingen auf die falsch negativen Ergebnisse der KH Spaltung im Rahmen der BR zurückzuführen.

Zahlenmäßige Verteilung der Diskordanzen auf die Keimspezies s. Tabelle 5.

6. Diskussion

6.1 Technische Bewertung des API-Systems

Ein wichtiger Vorteil liegt in der Möglichkeit, die Zusammensetzung der Nährböden konstant zu halten. Fehler, welche durch die Herstellung von Nährböden durch nicht regelmäßig geschultes Personal sowie die Benutzung verschiedener Präparate auftreten können, fallen dadurch weg. Ergebnisse sind daher von Labor zu Labor vergleichbarer. Die einfache Lagerung, die leichte Beschickung und vor allem die große Anzahl der zur Verfügung stehenden Reaktionen sind weitere Vorteile. Entscheidend ist der Vorteil gegenüber der BR, mit einer Kolonie das ganze System beimpfen zu können; dies ist bei der BR, je nach Anzahl der Testreaktionen, nicht immer möglich. Als Folge all dieser technischen Vorteile des API-Systems ist es zur Auswertung mittels Verfahren der numerischen Taxonomie besonders gut geeignet. Es ist daher die Möglichkeit zu der bereits oben erwähnten Vergleichbarkeit und zentralisierten Auswertung der Ergebnisse in epidemiologischer Sicht gegeben.

6.2 Handhabung, Beurteilung und Fehlerquellen des API-Systems

Die Handhabung sollte streng gemäß den Anweisungen des Herstellers erfolgen. Aber auch dann lassen sich unklare Ablesungen nach unseren Ergebnissen nicht ganz vermeiden. Schlecht sind nach unseren Erfahrungen die Farbtafeln von Analytab Products (1), da die Farben ungenau wiedergegeben werden.

Läßt sich ein Keim taxonomisch nicht zuordnen, so liegt nach Bartoli (3) entweder ein technischer Fehler oder ein atypischer Stamm vor. Sneath (16) und Butler (6) beschrieben in ihren Arbeiten, daß bei wiederholter Testung von Keimen mit dem API-System diese in einzelnen

biochemischen Reaktionen ihr Verhalten geändert hatten. Eine andere Keimdiagnose resultierte daraus jedoch nur in den seltensten Fällen. Fehler in der Diagnose basieren meist auf anderen Ursachen, z.B. Austrocknen der Plastikbehälter, Überimpfung von zwei verschiedenen Stämmen, gleichzeitige Inokulation von Nährböden, Überfüllung der einzelnen Küvetten und dadurch Interferenz der Reaktionen, zu hohe Keimkonzentrationen. Diese Fehler sind durch sorgfältiges Arbeiten vermeidbar.

Geht man in der Beurteilung nicht starr von den Einzelreaktionen aus, sondern beachtet das ganze Bild, wie Intensität der Farben und ihre Reihenfolge, so wird die Diagnose wesentlich erleichtert. Dazu gehört eine gewisse Erfahrung, z.B. bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit oder in wieviel Prozent positive oder negative Ergebnisse zu erwarten sind. Man stellt sich daher am besten eine eigene "Eichkurve" auf und kann so am schnellsten atypische Stämme erfassen und oben genannte Fehler vermeiden.

Das mitgelieferte tabellarische Schema zur Differenzierung erweckt bei der ersten Handhabung den Eindruck einer leichten taxonomischen Zuordnung der Keime. Das ist nach eigenen Erfahrungen und auch nach Beobachtung bei MTA manchmal mit größeren Fehlern verbunden. Eine erste grobe Zuordnung der getesteten Keime in bestimmten Klassen gelingt besser mit einem Schema, wie es unter 6.5 beschrieben ist, als mit Tabellen oder Entscheidungsdiagrammen in der Hand eines Anfängers oder einer MTA. Für die endgültige taxonomische Zuordnung ist ein numerisches System eine gute Hilfe zusammen mit laborinternen und epidemiologischen Erfahrungen. Unabkömmlich sind aber weitere Grundreaktionen der Taxonomie, wie Gram-Farbverhalten, Morphologie, Wachstumsphysiologie, Oxydase-Nachweis, OF-Test und Beweglichkeit für eine sichere Differenzierung.

6.3 Grad der Differenzierung und Grenzen des Einsatzes des API-Systems

Allgemein zeigte sich, daß leicht zu differenzieren war zwischen den verschiedenen *Proteus*-Typen und *Providencia*, sowie zwischen Klebsiellen und *Enterobacter*, da die Klebsiellen im ODC-Test laut Angaben von Cunnard D. Fay (8) negativ reagieren, die *Enterobacter* aber mit Ausnahme von *Enterobacter agglomerans* (*Erwinia*) ODC positiv sind. Schwieriger gestaltete sich die Unterteilung der *Enterobacter* Gruppe in die einzelnen Typen. Einfach war die Diagnose bei *Pseudomonas aeruginosa* und *E. Coli* zu stellen, obgleich bei letzterem Keim des öfteren Typen auftraten, die Übergänge zu den Shigellen zeigten.

Eine Unterteilung der Salmonellen, die den serologischen Subtypen entspricht, war auch mit dem API nicht möglich, lediglich bestimmte Biotypen wurden sichtbar, die sich z.B. in der Spaltung von Inosit oder der Stärke der H_2S -Bildung unterschieden. Von den getesteten Salmonellen ließ sich nur *Salmonella typhi* deutlich abgrenzen, die ODC, Citrat und Glucose negativ war.

Schwierigkeiten traten auch bei der Diagnose von *Aeromonas liquefaciens* auf, da er mit der *Enterobacter*-Gruppe verwechselt werden kann, sowie bei den Laktose negativen Keimen, die sich nicht als *Adwardsiella*, *Alcalescens* dispar, *Salmonella* oder *Proteus* diagnostizieren lassen.

Zu den Laktose negativen Keimen, die in der Routine häufig isoliert werden, gehört z.B. *Alcaligenes faecalis*, dessen Diagnose mit Hilfe des API nur schwer zu stellen ist.

Ebenso ist eine Diagnose des hier getesteten *Flavobacterium* sowie der *Pasteurella* allein mit Hilfe des API-Systems kaum möglich. Washington und Smith (15) identifizierten 93 bzw. 96,4 % der von ihnen untersuchten Keime, dabei ist jedoch fraglich, ob z.B. eine *Herbicola lathyri* routinemäßig erfaßbar ist. Trotz der diagnostischen Schwierigkeiten, betreffend die oben erwähnten Keimspezies, erfüllt das API-System die in der Einleitung geforderten Kriterien an eine so weit wie möglich gehende taxonomische

Zuordnung. Man muß sich jedoch im klaren darüber sein, daß das API auch nur einen Schritt in der Diagnostik darstellt, da vor Anwendung der Nachweis erbracht werden muß, daß Gram negative Stäbchenbakterien zur Testung gelangen. Ferner lassen sich manche Keime, z.B. E. Coli, mit genügender Sicherheit durch herkömmliche Methoden diagnostizieren, gleiches gilt z.B. auch für Proteus, so daß also für eine sichere Diagnose es nicht unbedingt notwendig ist, alle Keime mit API zu testen. Nitrit- und Oxydase-Test tragen zwar nicht zur Differentialdiagnose bei, sind aber wichtig für die Abgrenzung der Enterobacteriaceen von anderen Familien.

Dabei hat der Oxydase-Test den Nachteil, daß er relativ umständlich zu bewerkstelligen ist bzw. die Reagenzien nur wenige Tage haltbar sind. Von den hier zu den anderen Familien gehörigen Keimen waren unter zusätzlicher Durchführung des Oxydations-Fermentationstestes *Aeromonas liquefaciens* und *Pseudomonas aeruginosa*, letzterer unter Zuhilfenahme der Kulturmorphologie, mit API gut zu diagnostizieren.

6.4 Forderung an die Durchführung der großen Bunten Reihe

Eine Keimdiagnose der Enterobacteria nach klinisch wichtigen Kriterien läßt sich aus bestimmten Leitreaktionen ermitteln, s. 6.5. Will man eine gleichwertige Typisierung mit der klassischen BR erreichen, so ist man im diagnostischen Labor darauf angewiesen, meist Teststreifen für Oxydase oder PAD-Nachweis zu verwenden. Für viele der verwendeten Nährmedien werden außerdem verschiedene Zeiträume für die Bebrütungsdauer angegeben. Daraus ergeben sich zeitlich große Diskrepanzen, was eine rasche Keimdiagnose im Sinne der Klinik stark verzögert. So konnte der Christensen Agar nach 6 Stunden abgelesen werden, während zum Nachweis von ODC ein Zeitraum von 4 Tagen Bebrütungsdauer angegeben wird. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, alle Keime, die nach der Erstdifferenzierung anhand von

mikroskopischem Befund, Koloniemorphologie, Laktosespaltung, Verhalten auf polytropen Nährmedien, wie SIM, Kligler, LIA und Urease-Nachweis nicht genügend sicher zugeordnet werden können mit Hilfe eines vorfabrizierten und standardisierten Testbesteckes zu untersuchen.

Für die Reaktion des API hat sich bei uns dabei folgendes Vorgehen im Labor bewährt.

6.5 Vorschlag zur praktischen Handhabung des API

Bei der Ablesung des API-Systems wird als erste Frage geprüft, ob der Keim TDA positiv ist, wenn ja, werden nach beigefügtem Schema die verschiedenen Untergruppen der Proteus.Providencia Spezies weiter differenziert.

1. Leitreaktion: TDA positiv:

dann ist zu differenzieren zwischen:

	GEL	ODC	URE	IND
Prot. vulgaris	+	-	+	+
mirabilis	+	+	+	-
rettgeri	-	+	+	+
morganii	-	+	+	+
Providencia	-	-	-	+

Als zweite Frage wird geprüft, ob der Keim H_2S positiv ist, wenn ja, werden nach beigefügtem Schema die Bakterienspezies Salmonella, Arizona und Citrobacter unterschieden.

2. Leitreaktion: H_2S positiv:

dann ist zu differenzieren zwischen:

	GEL	ONPG	LDC	URE
Salm.	-	-	+	-
Citrob.	-	+	-	+
Arizona	d	+	+	+

Als dritte Frage wird geprüft, ob der Keim Indol+ ist, wenn ja, werden die Keime den entsprechenden Gruppen zugeordnet.

3. Leitreaktion: Indol positiv:

dann ist zu differenzieren zwischen:

	CIT	INO	MAN	GEL	OXY	ONPG
E. coli	-	-	+	-	-	+
AD-Gruppe	-	-	+	-	-	-
Shigella	-	-	d	-	-	d
Aeromonas	-	+	+	d	+	d

Als vierte Frage wird geprüft, ob der Keim CIT+ ist. Wenn ja, wird nach beigefügtem Schema weiter differenziert. Dabei kann die Klebsiella-Gruppe durch Beurteilung der Beweglichkeit sowie durch den negativen Ausfall der ODC-Reaktion von der Enterobactergruppe unterschieden werden.

4. Leitreaktion: Citrat positiv:

dann ist zu differenzieren zwischen:

	ONPG	ODC	GEL	OXY
Klebsiellae	+	-	-	-
Pseudomonas	-	-	+	+
Enterobacter	+	+	-	-
Serratia	+	+	+	-

* Ausnahme Enterobacter agglomerans

Weitere biochemische Reaktionen der einzelnen Keimspezies sind aus der entsprechenden Literatur zu entnehmen.

7. Zusammenfassung

Insgesamt wurden 190 Keime mit dem API-System getestet. Als erster Punkt wurde unter Anwendung von 180 Keimspezies die Eindeutigkeit der abzulesenden Farbtöne beurteilt. Dabei stellte sich heraus, daß von 3600 Reaktionen 4,5 % nicht eindeutig beurteilt werden konnten, d.h. es lagen Mischfarben vor.

Als zweiter Punkt wurde anhand von 10 Keimspezies die Abhängigkeit des Farbumschlagzeitpunktes von der Keimkonzentration untersucht. Dabei gelangten Konzentrationen von 10^1 , 10^3 , 10^5 und 10^7 Keimen/ml zur Anwendung (s. 5.2). Es stellte sich heraus, daß die zeitliche Abhängigkeit des Farbumschlages von der Keimkonzentration besonders ins Gewicht fiel, wenn die Keimdichte weniger als 10^5 Keime/ml betrug. Die Eindeutigkeit der Farbtöne war unabhängig von der Keimdichte. Insgesamt waren bei einer Konzentration von 10^7 Keimen/ml nach 6 Stunden Beträgungsdauer nur 50 % aller möglichen positiven Reaktionen ablesbar, nach 18 Stunden dagegen waren alle ablesbar.

Als dritter Punkt wurde die Übereinstimmung der Reaktionen des API-Systems mit denen der BR geprüft. In der BR kamen Fertig-nährböden von Oxoid und Merck zur Anwendung (s.3).

Bei 2258 vergleichbaren Reaktionen traten in 93,6 % konkordante Reaktionsergebnisse auf, 6,4 % der Reaktionen stimmten dagegen nicht überein. Die den Diskordanzen zugrunde liegenden Ursachen lassen sich teils durch die verschiedene Empfindlichkeit der im API und der BR zur Anwendung gelangenden Nährböden erklären, teilweise konnte keine Erklärung gefunden werden.

Als letzter Punkt wurde ein Weg ausgearbeitet, mit dessen Hilfe eine Folge von Leitreaktionen die taxonomische Zuordnung von häufig in der täglichen Praxis vorkommenden Keimen erleichtert werden soll.

Literaturangabe

- 1 API 10 Screen Biochemische Differenzierung der Enterobacteriaceae
Biologische Arbeitsgemeinschaft GmbH, 6230 Lich
- 2 API 20 Enterobacteriaceae
Biologische Arbeitsgemeinschaft GmbH, 6320 Lich
- 3 Bartoli, M., Choutecu, J., Ettori, D., Bonnett et Payen, G.
Utilisation En Pratique Journaliere D'Une Nouvelle Galerie
D'Indification Des Enterobacteries A propos des 671 Souches
Lyon Pharmaceutique 23, 2, 1972, 269-275
- 4 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology
Williams & Wilkins Company, Baltimore, Eight Edition, 1976
- 5 Blair, I.E., Lennette, E.H., Trouant, J.P.
Manual of clinical Microbiology
American Society for Microbiology, 1970
- 6 Butler, D.A., Lobregat, C.M., Gavan, T.L.
Reproducibility of the Analytab (API 20E) System
Clinical Microbiology, Oct.1975, 322-326
- 7 Cowan, S.T., Steel, K.J.
Manual for the identification of medical Bacteria
Cambridge University Press, 1970
- 8 Cunnard, D. Fay and Arthur L. Barry
Rapid Ornithine Decarboxylase Test for the Identification
of Enterobacteriaceae
Applied Microbiology, April 1972, 710-713
- 9 Doucet, M. et Paule, R.
Un Nouveau Dispositiv Pour L'Indification des Enterobacteries
Le Pharmacien Biologiste 71, 1971, 3-5
- 10 Instruction Manual for the Identification of Enterobacteriaceae
Analytab Products Inc. 919 Third Avenue, New York, N.Y. 10022
- 11 Guillermet, F.N. et Desbresles, A.M.B.
A propos de l'utilisation d'une micromethode d'identification
des Enterobacteries
Rev. Inst. Pasteur, Lyon 4, 1971, 71-78
- 12 Hallmann, L. und Burkhardt, K.
Klinische Mikrobiologie
Thieme Verlag Stuttgart, 1974

- 13 Mikrobiologisches Handbuch
E. Merck, Darmstadt, 1974
- 14 Oxoid-Handbuch, Nährböden und Chemie GmbH,
4230 Wesel, 2.Auflage, 1972
- 15 Smith, P.B., Thomforde, K.M., Rhoden, D.L., Balows, A.
API System: a Multitude Micromethod for Identification of
Enterobacteriaceae
Applied Microbiology, Sept.1972, 449-452
- 16 Sneath, P.H.
Test reproducibility in relation to identification
Int. J. Syst. Bacteriol. 24, 1974, 508-523
- 17 Washington, J., Pauline, K.W. and Martin, W.J.
Evaluation of Accuracy of Multitest Micromethod System
for Identification of Enterobacteriaceae
Applied Microbiology, Sept.1971, 267-269

Herrn Professor Dr.med. R. Ringelmann danke
ich für die freundliche Überlassung des The-
mas und die Unterstützung bei der Durchfüh-
rung der Arbeit.

Herrn Professor Dr.med. W. Bredt danke ich
für die freundliche Beratung.

Lebenslauf

Am 9. Juni 1949 wurde ich in Eschenbach/Opf. geboren. Meine Eltern wohnten in der benachbarten Stadt Grafenwöhr. 1953 übersiedelten wir nach Pfungstadt in Hessen, wo mein Vater als technischer Angestellter in einer Druckerei arbeitete.

In Pfungstadt besuchte ich von 1955 - 1959 die Volksschule und von 1959 - 1960 die Realschule. Nach bestandener Aufnahmeprüfung trat ich 1960 in die Sexta der Georg-Büchner-Schule in Darmstadt ein. Im Januar 1967 wechselte ich an das Schuldorf Bergstraße, an dem ich im sprachlichen Zweig 1968 die Reifeprüfung ablegte.

Nach erfolgreicher Bewerbung zum Medizinstudium immatrikulierte ich mich im Herbst 1968 an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Hier bestand ich am 1.10.1969 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 26.3.1971 die ärztliche Vorprüfung, nach welcher ich das Studium der klinischen Semester, ebenfalls in Mainz, begann. Im Frühjahr 1972 erhielt ich ein Thema für eine Doktorarbeit im Mikrobiologischen Institut der Universitätskliniken in Mainz.

Am 1.12.1972 heiratete ich die Diplom-Bibliothekarin Dorothea Mäger. Unser Sohn Christoph wurde am 16.6.1973 geboren. Das medizinische Staatsexamen bestand ich im Juni 1974 in Mainz.

Nach Ableistung der Medizinalassistenten-Zeit im Kreiskrankenhaus Jugenheim und an den Städtischen Kliniken Darmstadt erhielt ich am 17.9.1975 vom Land Rheinland-Pfalz die Approbation als Arzt. Zur Zeit bin ich als Assistenz-Arzt auf der geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Jugenheim a.d.B. angestellt. Mein Berufsziel ist Arzt für Allgemeinmedizin.

